



TUGAS AKHIR - SB141510

# OPTIMASI PRODUKSI KERATINASE OLEH BAKTERI *Bacillus* SLII-I DALAM MEDIUM LIMBAH BULU AYAM

AHMAD MARZUKI R.  
1510100053

Dosen Pembimbing  
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT

Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015





**FINAL PROJECT - SB141510**

# **OPTIMIZATION PRODUCTION OF KERATINASE BY *Bacillus* SLII-I FERMENTED IN MEDIUM FEATHER MEAL**

**AHMAD MARZUKI R.  
1510100053**

**Advisor Lecturer  
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT**

**Biology Department  
Faculty of Mathematics and Natural Science  
Institute of Technology Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015**



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya. Sholawat serta salam semoga tetap terlimpahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Alhamdulillah atas rahmat, taufik, hidayah serta inayah-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul **Optimasi Produksi Keratinase Oleh *Bacillus* SLII-I Dalam Medium Limbah Bulu Ayam**. Tugas Akhir ini dilakukan mulai September 2013 – Januari 2015 dan disusun untuk memperoleh gelar sarjana (S1) di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya. Penyusunan Tugas Akhir ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT. selaku dosen pembimbing Tugas Akhir. Maharani Pertiwi K. S.Si, M.biotech. sebagai dosen pembimbing laboratorium. Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si selaku dosen penguji I. Ir. Sri Nurhatika, MP selaku dosen penguji II. Teman-teman angkatan 2010 dan pegawai/karyawan Jurusan Biologi ITS atas kerjasama dan kebersamaanya, serta orang tua dan keluarga besar semuanya atas bimbingan,dukungan dan doanya.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih belum sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun penulis harapkan demi perbaikan selanjutnya. Penulis berharap semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat serta dapat memberikan informasi bagi semua pihak. Akhir kata, semoga Allah SWT memberikan rahmat, taufik, hidayah, serta inayah-Nya kepada kita semua. Amin.

Surabaya, 12 Januari 2015

Ahmad Marzuki R.

## LEMBAR PENGESAHAN

### OPTIMASI PRODUKSI KERATINASE OLEH BAKTERI *Bacillus* SLII-I DALAM MEDIUM LIMBAH BULU AYAM

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

**AHMAD MARZUKI R.**  
**NRP. 1510 100 053**

**Disetujui Oleh Pembimbing Tugas Akhir**

Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT.....(Pembimbing)

Surabaya, 12 Januari 2015

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si  
NIP. 19690907 199803 2 001

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
ABSTRAK .....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
KATA PENGANTAR .....	xi
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Permasalahan .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan .....	3
1.5 Manfaat .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Limbah Bulu Ayam .....	5
2.2 Kandungan Protein Bulu Ayam .....	5
2.3 Keratin .....	6
2.4 Enzim Keratinase .....	8
2.5 Bakteri Penghasil Keratinase .....	9
2.6 <i>Bacillus</i> SL II-I .....	10
2.7 Isolasi Enzim .....	12
2.8 Pemurnian Enzim .....	12
<b>BAB III METODOLOGI</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	15
3.2 Pembuatan Tepung Bulu Ayam .....	16
3.3 Pembuatan Starter .....	16
3.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan .....	16
3.5 Optimasi Produksi Enzim .....	17
3.6 Persiapan Ekstrak Enzim Kasar .....	17
3.7 Isolasi Pemurnian Enzim .....	18

3.7.1 Metode amonium sulfat .....	18
3.8 Metode isoelektrik point.....	18
3.9 Karakterisasi Enzim .....	19
3.9.1 Kandungan protein .....	19
3.9.2 Elektroforesis SDS-PAGE.....	19
3.9.3 Aktivitas enzim .....	20
3.10 Rancangan Penelitian .....	21
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat <i>Bacillus</i> SLII-I .....	23
4.2 Metode Amonium Sulfat .....	26
4.3 Metode Isoelektrik point.....	28
4.4 Elektroforesis SDS-PAGE.....	29
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan .....	31
5.2 Saran .....	32
 DAFTAR PUSTAKA .....	 33
LAMPIRAN .....	41



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbandingan Komposisi Kandungan Asam Amino Tepung Bulu Ayam, Tepung Ikan dan Bungkil Kedelai.....	6

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Ikatan Sistin Disulfida Keratin .....	7
Gambar 3.1 Skema Kerja Penelitian .....	15
Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan Isolat <i>Bacillus</i> SLII-I.....	24
Gambar 4.2 Aktifitas Keratinase pada Minimal Medium Feather Meal pH 7 Kondisi Optimum .....	25
Gambar 4.3 Aktivitas Keratinase Tiap Fraksi Presipitasi Amonium Sulfat.....	27
Gambar 4.4 Titik <i>Isoelectric Point</i> Keratinase ....	28
Gambar 4.4 SDS-PAGE.....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Komposisi Medium.....	41
Lampiran 2: Analisis Data.....	42
Lampiran 3: Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Medium Nutrien Broth pH 7.....	49
Lampiran 4: Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Medium Nutrien Broth pH 8.....	50
Lampiran 5: Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Medium Nutrien Broth pH 9.....	51
Lampiran 6: Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Minimal Medium Feather Meal pH 7.....	52
Lampiran 7: Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Minimal Medium Feather Meal pH 8.....	53
Lampiran 8: Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Minimal Medium Feather Meal pH 9.....	54

Lampiran 9:	Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Minimal Medium Feather Meal Pepton 1% pH 7.....	55
Lampiran 10:	Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Minimal Medium Feather Meal Pepton 1% pH 8.....	56
Lampiran 11:	Data Optimasi Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus</i> SLII-I dalam Minimal Medium Feather Meal Pepton 1% pH 9.....	57
Lampiran 12:	Uji Bradford.....	58
Lampiran 13:	Foto Penelitian.....	59

# OPTIMASI PRODUKSI KERATINASE OLEH BAKTERI *Bacillus* SLII-I DALAM MEDIUM LIMBAH BULU AYAM

**Nama Mahasiswa : Ahmad Marzuki R.**  
**NRP : 1510 100 053**  
**Jurusan : Biologi**  
**Dosen Pembimbing : Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo,**  
**MT**

## Abstrak

*Keratin adalah protein yang sulit didegradasi karena terdapat ikatan sistin disulfida. Enzim keratinase yang diproduksi oleh Bacillus SLII-I diketahui mampu memutus ikatan disulfida. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi keratinase secara optimum melalui analisis profil kurva pertumbuhan bakteri, kandungan protein, dan aktivitas keratinase dengan memvariasikan kondisi pH dan komposisi medium limbah bulu ayam. Optimasi keratinase dilakukan berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri yang dikulturkan pada 3 jenis medium (Nutrien broth, minimal medium feather meal, minimal medium feather meal pepton 1%) dan 3 jenis pH (7, 8, 9). Analisis optimasi diperoleh dari profil kurva pertumbuhan serta karakterisasi menggunakan titik isoelektrik, dan SDS-PAGE yg didahului dengan parsial purifikasi menggunakan ammonium sulfat. Dari hasil diperoleh produksi keratinase yang optimum pada minimal medium feather meal pH 7 dengan aktifitas keratinase tertinggi adalah 3.4 Unit/ml. Titik isoelektrik keratinase diketahui pada pH 5.3 sedangkan berat molekul berdasarkan hasil SDS-PAGE adalah 38 kDa.*

*Kata kunci: Bacillus SLII-I, keratin, optimasi keratinase, profil pertumbuhan bakteri.*



## OPTIMIZATION OF KERATINASE PRODUCTION BY *Bacillus* SLII-I FERMENTED IN MEDIUM FEATHER MEAL

**Name** : Ahmad Marzuki R.  
**NRP** : 1510 100 053  
**Department** : Biologi  
**Advisor Lecturer** : Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT

### Abstract

Keratin is a protein that is difficult to degrade because there is cystine disulfide bond. Keratinase enzyme produced by *Bacillus* SLII-I is known to break the disulfide bonds. The purpose of this research is to produce optimum keratinase through bacterial growth profile analysis, protein content, and keratinase activity by varying conditions of pH and composition of medium feather meal. Keratinase optimization performed by the growth curve of bacteria cultured in three types of medium (Nutrien broth, minimal medium feather meal, and minimal medium feather meal pepton 1%) and three types of pH (7, 8, and 9). Optimization analysis is obtained from the profile curve of growth, characterization using isoelectric point, and SDS-PAGE which was preceded by a partial purification using ammonium sulfate. The results obtained optimum keratinase production in minimal medium feather meal pH 7 with the highest keratinase activity is 3.4 Units / ml. Keratinase known isoelectric point at pH 5.3 and the molecular weight by SDS-PAGE results is 38 kDa.

*Key word* : bacterial growth profile, *Bacillus* SLII-I, keratin, keratinase optimization.

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Pakan ternak sebagai penyedia sumber protein hewani harganya masih relatif mahal dikarenakan Indonesia masih mengandalkan produk impor. Jumlah Impor pakan ternak masih sangat tinggi karena produk dalam negeri belum mampu memenuhi kebutuhan pasar. Hal tersebut menjadi masalah utama bagi peternak dalam usahanya meningkatkan produksi ternak. Oleh karena itu perlu dilakukan usaha pemanfaatan limbah organik sebagai sumber protein alternatif untuk menekan biaya pakan (Sitompul, 2004).

Bulu ayam adalah salah satu produk limbah organik hasil usaha pemotongan ayam yang masih belum dimanfaatkan secara optimal. Pemotongan ayam menghasilkan rata-rata bulu sebanyak 4-9% dari total berat ayam (Adiati *et al.*, 2002; Ketaren, 2008). Pada tahun 1998, beban limbah padat yang dihasilkan industri peternakan ayam di Jawa Timur sebesar 121.793 ton (Badan Statistik Lingkungan Hidup dan Wilayah, 2000). Pada tahun 1999 hingga tahun 2011 konsumsi daging ayam di Jawa Timur meningkat dari 25.924.000 kg (Badan Pusat Statistik, 2005) menjadi 65.429.000 kg (Badan Pusat Statistik, 2012). Peningkatan kebutuhan masyarakat terhadap konsumsi daging ayam akan meningkatkan limbah bulu ayam yang dihasilkan. Limbah bulu ayam biasanya dibuang, ditumpuk sebagai *land filling* atau dibakar yang mengakibatkan pencemaran lingkungan. (Joshi *et al.*, 2007).

Bulu ayam memiliki kandungan protein cukup tinggi. Murtidjo (1995) mengemukakan, protein kasar tepung bulu ayam mencapai 86,5% dan energi metabolis 3.047 kkal/kg, selain itu bulu ayam mengandung kadar protein jauh lebih tinggi dibanding tepung ikan dan memiliki protein kasar cukup tinggi (Rasyaf, 1993). Sehingga bulu ayam merupakan limbah peternakan yang dapat dijadikan sebagai bahan pakan alternatif



pengganti sumber protein hewani dalam formulasi ransum ayam (unggas).

Keratin adalah salah satu jenis protein yang terdapat pada limbah bulu ayam, keratin merupakan struktur protein tidak larut yang terdapat pada kulit, wol, rambut, tanduk, lapisan stratum korneum. Keratin memiliki ikatan sistin disulfida, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik menyebabkan keratin bersifat kaku dan stabil sehingga sangat sulit untuk dirombak dan resisten terhadap perlakuan fisik, kimia, dan biologis (Kaluzewska *et al.*, 1991).

Keratin dapat dirombak dengan kelompok enzim protease. Keratinase termasuk kelompok enzim protease yang dapat menghidrolisis keratin dengan memecah ikatan sistin disulfida pada keratin, sehingga memainkan peranan penting dalam perombakan keratin menjadi protein sederhana (Sun dan Lee, 2001). Keratinase diproduksi oleh bakteri, misalnya genus *Bacillus*. Bakteri genus *Bacillus* mampu hidup pada kisaran suhu dan pH yang lebar (Holt *et al.*, 1994). Genus *Bacillus* merupakan salah satu bakteri yang mempunyai berbagai macam kemampuan yang dapat dikembangkan dalam dunia industri. Menurut Atlas dan Bartha (1987), *Bacillus* sangat potensial untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi karena mempunyai sifat sifat yang unggul seperti kisaran pertumbuhan yang luas, pembentukan spora, memiliki habitat yang luas, tahan terhadap senyawa antiseptik, bersifat aerob atau fakultatif aerob, memiliki kemampuan enzimatik yang beragam, dan beberapa diantaranya mampu melakukan biodegradasi terhadap banyak senyawa xenobiotik.

Penelitian Sivakumar (2007), melaporkan bahwa kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim keratinase dapat ditingkatkan dengan menambahkan pepton 0,1% ke dalam medium pertumbuhannya. *Bacillus* mampu tumbuh dalam medium sintetik (Johnvesly dan Naik, 2001), yaitu medium minimal *feather meal*. *Bacillus* SLII-I koleksi Laboraturium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS diduga mampu mendapatkan sumber C (karbon) dari keratin bulu

ayam yang terdapat pada medium minimal *feather meal*. Maka dalam penelitian ini dilakukan optimasi, produksi, dan karakterisasi keratinase dari *Bacillus* SLII-I.

### 1.2 Rumusan Permasalahan

Telah diisolasinya isolat *Bacillus* SLII-I yang mampu mendegradasi bulu ayam dengan enzim keratinase, tetapi belum ditemukan komposisi yang tepat untuk menghasilkan keratinase. Sehingga rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah menentukan pH dan komposisi medium yang tepat dalam memproduksi keratinase secara optimal pada suhu 40°C.

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam pelaksanaan tugas akhir ini adalah :

1. Mendapatkan produktivitas enzim keratinase yang maksimum dengan memvariasikan pH dan komposisi medium.
2. Medium yang digunakan adalah *nutrien broth*, medium minimal *feather meal* (MMFM) dan medium minimal *feather meal* (MMFM) dengan penambahan pepton 1%.
3. Suhu yang digunakan dalam penelitian ini 40°C dengan pH 7, 8 dan 9.
4. Pertumbuhan bakteri keratinase yakni *Bacillus* SLII-I diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.
5. Aktivitas enzim keratinase diukur berdasarkan nilai *optical density* dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

### 1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi keratinase secara optimum melalui analisis profil pertumbuhan bakteri, kandungan protein, dan aktivitas keratinase dengan memvariasikan kondisi pH dan komposisi medium limbah bulu ayam.

### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah memperoleh hasil optimum keratinase yang dapat bermanfaat untuk produksi enzim dalam skala yang lebih besar, sehingga dapat diterapkan pada sektor industri, baik dalam bidang pengolahan limbah peternakan, industri pangan, industri farmasi dan dimanfaatkan untuk meningkatkan efisiensi dan efektifitas pemberian pakan ternak. Diharapkan juga penelitian dapat dijadikan cara untuk mengurangi timbunan limbah bulu ayam.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Limbah Bulu Ayam**

Limbah bulu ayam merupakan hasil samping usaha pemotongan ayam. Daur ulang limbah bulu ayam dapat menyediakan alternatif pakan ternak yang murah dan bergizi. Namun, kemampuan degradasi keratin yang rendah adalah masalah dalam proses pembuatan pakan ternak berbahan dasar bulu ayam (Sinoy *et al.*, 2011). Pada tahun 1998, industri peternakan ayam di Jawa Timur menghasilkan limbah padat berupa bulu dan bagian yang tidak digunakan sebanyak 121.793 ton (Statistik Lingkungan Hidup dan Wilayah, 2000). Hasil pemotongan ternak unggas menghasilkan rata-rata bulu sebanyak 4-9 % dari bobot hidup (Adiati *et al.*, 2002; Ketaren, 2008). Pengolahan secara fisik mengurangi kualitas dan kemampuan cerna protein bulu ayam (Riffel *et al.*, 2006), karena akan merusak asam amino yang tidak tahan panas seperti metionin, lisin dan triptofan (Mazzoto *et al.*, 2011).

#### **2.2 Kandungan Protein Bulu Ayam**

Limbah bulu ayam mengandung  $\pm$  90% protein *insoluble* dalam bentuk keratin (Jayalaksmi *et al.*, 2011) serta asam amino esensial seperti sistein, arginin dan threonin (Tiwary *et al.*, 2012). Kandungan protein kasar bulu ayam lebih tinggi dari kandungan protein kasar bungkil kedelai (42,5 %) dan tepung ikan (66,2%), dimana bungkil kedelai dan tepung ikan adalah komponen yang biasa dipakai dalam ransum komersil pada umumnya (Adiati *et al.*, 2002). Sehingga bulu ayam dapat dijadikan sumber alternatif ransum.

Limbah bulu ayam memiliki nilai cerna rendah karena struktur keratin pada bulu ayam tidak mampu didegradasikan oleh enzim protease pada umumnya (Pissuwan *et al.*, 2008). Nilai cerna bulu ayam untuk bahan kering dan bahan organik masing-masing hanya sebesar 5,8% dan 0,7%. Pada rumen ruminansia,

protein bulu ayam yang tidak dicerna sebesar 53,6 hingga 87,9% (Adiati *et al.*, 2002). Berikut adalah perbandingan kandungan asam amino antara tepung bulu ayam, tepung ikan, dan bungkil kedelai.

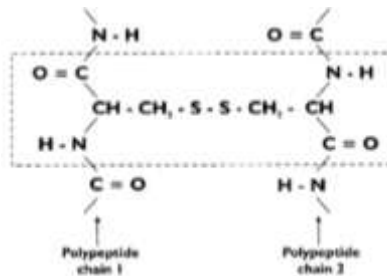
Tabel 2.1 Perbandingan Komposisi Kandungan Asam Amino Antara Tepung Bulu Ayam, Tepung Ikan dan Bungkil Kedelai (Ketaren, 2008; Sitompul, 2004; Saravanan, 2012)

Asam amino (%)	Tepung bulu ayam	Tepung ikan	Bungkil kedelai
Arginin	5,57	4,21	3,14
Histidin	0,95	1,74	1,17
Isoleusin	3,91	3,23	1,96
Leusin	6,94	5,46	3,39
Lisin	2,28	5,47	2,69
Methionin	0,57	2,16	0,62
Penilalanin	3,94	2,82	2,16
Treonin	3,81	3,07	1,72
Triptofan	0,55	0,83	0,74
Valin	5,93	3,90	2,07
Aspartat	6,00	4,41	3,06
Serin	16,0	3,75	1,20
Glutamat	12,11	7,05	3,81
Prolin	12,0	3,93	2,40
Glisin	6,92	3,83	2,65
Alanin	3,44	3,19	2,95
Sistin	8,85	0,63	0,65
Tirosin	1,10	1,59	2,60
Asparagin	4,40	3,81	2,78
Glutamin	7,62	5,32	4,49

### 2.3 Keratin

Keratin adalah makromolekul protein dengan kestabilan yang sangat tinggi dan tingkat degradasi yang rendah. Keratin

terdiri dari komponen ikatan sistin disulfida, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik molekul keratin (Vigneshwaran *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010). Keratin adalah struktur protein tidak larut (Jahan *et al.*, 2010) yang terdapat pada kulit hewan, tanduk, rambut, bulu domba dan bulu ayam. Keratin memerlukan enzim keratinase ekstraselular untuk proses degradasi. Keratin memiliki ikatan sistin disulfida yang terbentuk antara asam amino sistein yang mengandung gugus SH. Jika dua unit sistein berikatan, maka terbentuklah sebuah jembatan disulfida melalui oksidasi gugus-gugus -SH seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.1 (Ketaren, 2008).



Gambar 2.1 Ikatan Sistin Disulfida Keratin (Saravanan, 2012).

Protein serat keratin terbentuk dari ikatan silang antara rantai-rantai asam amino yang berdekatan sehingga molekul air sukar menerobos struktur ini, sehingga tidak larut di dalam air (hidrofobik) (Ketaren, 2008). Keratin merupakan protein serat yang tidak larut dalam air, rantai peptida pada protein keratin terbelit dalam bentuk pilin atau heliks dan saling berhubungan dengan ikatan disulfida dan ikatan hidrogen sehingga keratin sulit dicerna oleh enzim proteolitik. (Pissuwan *et al.*, 2005; Zang *et al.*, 2009). Bagi mikroorganisme keratinolitik, keratin yang mengandung banyak asam amino sistin dimanfaatkan sebagai sumber sulfur, karbon, dan nitrogen. Kadar sistin dalam rambut atau bulu beberapa spesies mahluk hidup di alam sangat

bervariasi dan kadar sistin tersebut menentukan tingkat kesulitan degradasi rambut/bulu oleh mikroba (Kunert, 2000).

## **2.4 Enzim Keratinase**

Enzim adalah substansi yang dihasilkan oleh sel hidup dan berperan sebagai katalisator pada reaksi kimia organisme. Katalisator adalah substansi yang mempercepat reaksi tetapi pada hasil reaksi, substansi tersebut tidak berubah. Aktivitas enzim sangat spesifik karena pada umumnya enzim tertentu hanya akan mengkatalisis satu reaksi saja. Sebagai contoh, laktase menghidrolisis gula laktosa tetapi tidak berpengaruh terhadap disakarida yang lain. Hanya molekul laktosa saja yang akan sesuai dalam sisi aktif molekul (Gaman, 1994).

Keratinase adalah enzim ekstraselular yang digunakan untuk biodegradasi keratin (Suntornsuk *et al.*, 2004). Keratinase akan dihasilkan hanya jika terdapat substrat keratin. Keratinase memecahkan ikatan disulfida untuk mendegradasi keratin. Beberapa mikroorganisme penghasil keratinase memiliki kemampuan untuk mendegradasikan bulu ayam, rambut, kuku, bulu domba, dan sebagainya. Beberapa mikroorganisme keratinolitik telah diisolasi dan dikarakterisasi dari sampel tanah yang di sekitarnya terdapat bulu ayam (Sinoy *et al.*, 2011). Keratinase pada umumnya memiliki berat molekul 20-50 kDa (Zang *et al.*, 2009). Keratinase termasuk dalam kelompok hidrolase yang mampu menghidrolisis keratin lebih efisien dibandingkan protease lainnya (Vigneshwaran *et al.*, 2010; Kanmani *et al.*, 2011).

Kelebihan enzim dibandingkan katalis biasa adalah dapat meningkatkan produk beribu kali lebih tinggi, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, dan bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu. Enzim telah banyak digunakan dalam bidang industri pangan, farmasi dan industri kimia lainnya. Dalam bidang pangan misalnya amilase, invertase, glukosa-isomerase, papain, dan bromelin, sedangkan dalam bidang kesehatan contohnya amilase, lipase, dan protease. Enzim

dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Boyer, 1971).

Suhu yang tinggi akan menaikkan aktivitas enzim namun sebaliknya juga akan mendenaturasi enzim (Martoharsono, 1994). Peningkatan temperatur dapat meningkatkan kecepatan reaksi karena molekul atom mempunyai energi yang lebih besar dan mempunyai kecenderungan untuk berpindah. Ketika temperatur meningkat, proses denaturasi juga mulai berlangsung dan menghancurkan aktivitas molekul enzim. Hal ini dikarenakan adanya rantai protein yang tidak terlipat setelah pemutusan ikatan yang lemah sehingga secara keseluruhan kecepatan reaksi akan menurun (Lee, 1992).

Derajat pH optimal enzim adalah sekitar pH 7 (netral) dan jika medium menjadi sangat asam atau sangat alkalis enzim mengalami inaktivasi. Akan tetapi beberapa enzim hanya beroperasi dalam keadaan asam atau alkalis. Sebagai contoh, pepsin, enzim yang dikeluarkan ke lambung, hanya dapat berfungsi dalam kondisi asam, dengan pH optimal 2 (Gaman & Sherrington, 1994).

## **2.5 Bakteri Penghasil Keratinase**

Mikroorganisme adalah agen biologis penghasil enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Sebagai penghasil enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim. Adanya mikroorganisme yang unggul merupakan salah satu faktor penting dalam usaha produksi enzim. Oleh karena itu, eksplorasi mikroorganisme indigenous penghasil protease perlu dilakukan di Indonesia. Keragaman hayati yang tinggi memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan mikroorganisme yang potensial untuk dikembangkan sebagai penghasil enzim (Kosim dan Rosa, 2009).



Anitha (2012) melaporkan bahwa *Bacillus megaterium* (A1), *Bacillus licheniformis* 511 dan *Bacillus subtilis* 1-1 yang diisolasi dari tanah tempat pembuangan limbah bulu ayam Pasumalai, India memiliki aktivitas keratinase, masing-masing sebesar 72.875 U/mg, 242 U/mg dan 198 U/mg; setelah 96 jam, 48 jam dan 48 jam masa inkubasi pada suhu 35°C dan pH 7.5. *Crude* enzim keratinase *Bacillus licheniformis* mampu meningkatkan total asam amino pada bulu utuh dan tepung bulu komersil sebesar 7%. Dengan masa inkubasi 2 hari menggunakan 10 gram bulu ayam dapat menghasilkan aktivitas keratinase sebesar 301.2 unit/ml.

*Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis* berturut turut memiliki aktivitas enzim 319 unit/ml dan 412 unit/ml pada medium *feather meal* dengan kandungan bulu ayam 10 gram pada suhu 37°C dan waktu inkubasi 1 jam (Mazotto, 2011).

## 2.6 *Bacillus* SLII-I

Genus *Bacillus* merupakan salah satu bakteri yang mempunyai berbagai macam kemampuan yang dapat dikembangkan dalam skala industri. Menurut Atlas & Bartha (1987), *Bacillus* sangat potensial untuk dikembangkan dalam industri bioteknologi karena mempunyai sifat memiliki kisaran suhu pertumbuhan yang luas, pembentuk spora, kosmopolit, tahan terhadap senyawa-senyawa antiseptik, bersifat aerob atau fakultatif anaerob, memiliki kemampuan enzimatik yang beragam, dan beberapa diantaranya mampu melakukan biodegradasi terhadap banyak senyawa rekalsitran dan xenobiotik. Selain itu *Bacillus* tidak membutuhkan faktor tumbuh yang mahal.

Genus *Bacillus* merupakan bakteri yang berbentuk batang dapat dijumpai di tanah dan air termasuk pada air laut. Beberapa jenis menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis protein dan polisakarida kompleks. *Bacillus* spp membentuk endospora, merupakan gram positif, bergerak dengan adanya

flagel peritrikus, dapat bersifat aerobik atau fakultatif anaerobik serta bersifat katalase positif (Pelczar *et al.* 1976).

Genus *Bacillus* mempunyai sifat fisiologis yang menarik karena tiap-tiap jenis mempunyai kemampuan yang berbeda-beda, yaitu mampu mengdegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa hidrokarbon dan agar, mampu menghasilkan antibiotik, berperan dalam nitrifikasi dan denitrifikasi, pengikat nitrogen, pengoksidasi selenium, pengoksidasi dan pereduksi mangan (Mn), bersifat kemolitotrof, aerob atau fakultatif anaerob, asidofilik atau alkalifilik, psikrofilik, atau termofilik (Norris *et al.* 1981; Claus & Barkeley 1986).

*Bacillus* SLII-I diisolasi dari dataran tinggi dieng yang merupakan kawasan pegunungan vulkanik aktif dengan ketinggian  $\pm 2.000$  mdpl di daerah wonosobo, Jawa Tengah. Pegunungan dieng memiliki kawah yang khas dan berbeda tiap tahunnya, yaitu menghasilkan kawah hasil letusan magma dilokasi berbeda-beda.

### **Klasifikasi *Bacillus* spp.**

Tatanama klasifikasi bakteri diatur berdasarkan "*International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses*", yang ditetapkan tahun 1947 oleh International Committee on Bacteriological Nomenclature. Berdasarkan aturan tersebut maka, klasifikasi *Bacillus* spp. dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8<sup>th</sup> editions tahun 2004 adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Divisio	: Firmicutes
Classis	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Familia	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>Bacillus</i> spp.

## 2.7 Isolasi Enzim

Enzim dapat di isolasi dari makhluk hidup salah satunya mikroorganisme, metode untuk isolasi enzim antara lain metode ekstraksi, presipitasi, koagulasi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi (Judoamidjojo, dkk., 1992). Ada 2 macam jenis enzim yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah mengubah nutrien di sekitarnya sehingga nutrien tersebut masuk ke dalam sel. Sedangkan enzim intraseluler mensintesis bahan seluler atau menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel. Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2005).

Pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan serta pengumpulan endapan (Judoamidjojo, dkk., 1992). Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan merupakan cairan yang berisi enzim (Rahayu, 1990). Isolasi enzim ekstraseluler lebih tepat menggunakan metode sentrifugasi karena enzim ekstraseluler dilepaskan ke luar sel atau didalam media pertumbuhannya (Tsujibo *et al.*, 1992).

## 2.8 Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1995). Metode-metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi gel (McKee *et al.*, 2003). Metode pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar enzim disertai

pengadukan pada suhu rendah (Sorensen *et al.*, 1999). Garam yang ditambahkan adalah amonium sulfat, natrium sulfat, natrium fosfat dan lainnya, tergantung pada jenis enzim. Amonium sulfat lebih sering digunakan karena kelarutannya yang tinggi (Janson *et al.*, 1998). Selain itu amonium sulfat mudah didapatkan, harganya relatif murah, bersifat menstabilkan enzim serta dapat mencegah aktivitas enzim proteolitik (Yurnaliza, 2002).

Kelarutan protein dan kekuatan ion dipengaruhi oleh konsentrasi garam amonium sulfat yang ditambahkan. Semakin besar konsentrasi garam yang ditambahkan, maka terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik molekul air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik antara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa ini dinamakan *salting out*. *Salting out* dengan garam dapat digunakan untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya (Aulanni`am, 2005). Endapan enzim yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi dan supernatan yang dihasilkan digunakan untuk fraksinasi selanjutnya (Sorensen *et al.*, 1999).

**"Halaman ini sengaja dikosongkan"**

## BAB III METODOLOGI

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga dan laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS pada bulan April 2104 sampai Januari 2015. Langkah pertama dalam penelitian ini yaitu pembuatan tepung bulu ayam kemudian membuat starter isolat bakteri lalu di ukur kurva pertumbuhannya untuk mencari produksi enzim yang optimum dengan memvariasikan pH dan komposisi medium. Setelah itu dilakukan persiapan ekstrak enzim kasar kemudian isolasi enzim, pemurnian enzim dan karakterisasi enzim. Gambar 3.1 menunjukkan skema kerja penelitian.



Gambar 3.1 Skema Kerja Penelitian.

### 3.2 Pembuatan Tepung Bulu Ayam

Tepung bulu ayam yang memiliki sumber keratin, dibuat dengan metode Agrahari *et al.*, 2010 yang telah dimodifikasi. Pertama Bulu ayam dicuci bersih dan direbus selama 2-3 jam, kemudian dioven selama 8 jam pada suhu 50°C. Bulu ayam yang telah kering, digiling, digerus dengan mortar dan disaring dengan saringan tepung sehingga menjadi sebagai tepung bulu ayam.

### 3.3 Pembuatan Starter

Starter isolat *Bacillus* SLII-I dibuat dengan metode Kosim (2010) yang dilakukan secara bertahap. Diambil sebanyak 1 ose isolat *Bacillus* SLII-I pada medium padat Nutrien Agar (Lampiran 1) kemudian dimasukkan dalam 10 mL medium minimal *feather meal* (Lampiran 1), medium minimal dengan penambahan pepton 1% (Lampiran 1), sedangkan untuk medium *nutrien broth* (Lampiran 1) tanpa starter. Selanjutnya diinkubasi dengan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu ruangan. Setelah itu 5 ml biakan dipindahkan kedalam kedua medium tersebut yang baru sebanyak 45 ml dan diinkubasi kembali pada kondisi yang sama seperti kondisi sebelumnya. Kemudian sebanyak 10 ml biakan dipindahkan lagi ke dalam 90 ml medium baru dan diinkubasi dengan kondisi yang sama. Biakan tersebut diambil sebanyak 20 ml dipindahkan lagi ke dalam medium baru sejumlah 180 ml serta diinkubasi dengan kondisi yang sama. Hasil akhir biakan digunakan sebagai kultur starter.

### 3.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pada medium *nutrien broth*, isolat *Bacillus* SLII-I diinokulasikan pada medium sebanyak 250 ml. Sedangkan untuk kultur starter diambil sebanyak 25 ml dan dimasukkan kedalam 225 ml medium minimal *feather meal* (FM), medium minimal *feather meal* (FM) dengan penambahan pepton 1% dan diinkubasi selama 24 jam. Setiap jam diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer, dengan mengukur nilai absorbansi *optical*

*density* pada panjang gelombang 600 nm. Pengukuran dilakukan dengan cara, pertama biakan diambil sebanyak 0,2 ml lalu diencerkan dengan menambahkan 1,8 ml akuades steril lalu dihomogenkan. Kemudian biakan dimasukkan kedalam kuvet untuk diukur nilai *optical density* dengan spektrofotometer. Untuk blanko digunakan medium tanpa isolat dengan pengenceran 10 kali menggunakan akuades steril, yaitu 0,2 ml masing-masing medium modifikasi tanpa isolat ditambah dengan 1,8 ml akuades steril. Pengambilan sampel dilakukan tiap jam mulai jam ke-0 sampai jam ke-24 (Anitha *et al.*, 2012).

### 3.5 Optimasi Produksi Enzim

Pada medium *nutrien broth*, isolat diinokulasikan pada medium sebanyak 250 ml, sedangkan untuk starter isolat *Bacillus* SLII-I sebanyak 25 ml diinokulasikan ke dalam 225 ml medium baru medium minimal *feather meal* (FM) dan medium minimal *feather meal* (FM) dengan penambahan pepton 1%. di Erlenmeyer 500 ml dan diinkubasi dengan shaker inkubator dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali (Kosim, 2010). Menurut Sivakumar (2012), produksi enzim keratinase dapat dipengaruhi oleh suhu, pH, dan komposisi medium. Pada penelitian ini suhu yang digunakan yaitu 40 °C dengan pH 7, 8, dan 9. Setelah mendapat produksi enzim yang optimum, kemudian dilakukan inokulasi kedalam 500 ml untuk produksi enzim lebih besar.

### 3.6 Persiapan Ekstrak Enzim Kasar

Pembuatan ekstrak enzim kasar diambil dari hasil biakan yang dihomogenasikan lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi sebanyak 30 ml biakan dari ketiga pengulangan kultur. Biakan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang didapatkan merupakan ekstrak enzim kasar untuk pengukuran aktivitas keratinase dan disimpan dalam *freezer* (Anitha *et al.*, 2012).



### **3.7 Isolasi dan Pemurnian Enzim**

#### **3.7.1 Metode amonium sulfat**

Pemurnian parsial ekstrak kasar enzim protease dimurnikan dengan cara pengendapan bertahap  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dengan fraksi 0-30%, 30%-45%, 45%-60%, 60-75%, perlakuan tersebut dilakukan di dalam ice box yang berisi serpihan es batu. Untuk membuat fraksi 0-30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ditimbang sebanyak 3,52 g, kemudian ditambahkan ke dalam 20 mL larutan ekstrak enzim kasar dalam gelas beaker 50 mL. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas pengaduk. Setelah semua  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm, pada suhu 40°C selama 30 menit. Dihasilkan supernatan dan endapan. Kemudian dilanjutkan fraksi 30%-45%, supernatan dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 mL kemudian ditambah dengan 1,88 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Setelah semua larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim di sentrifugasi. Dihasilkan supernatan dan endapan.

Kemudian untuk fraksi 45%-60%, supernatan fraksi 30%-45% dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 mL kemudian ditambah dengan 1,97 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Setelah larut dibiarkan 1 jam. Endapan enzim disentrifugasi. Dihasilkan supernatan dan endapan. Untuk pembuatan fraksi 60-75%, Supernatan dari fraksi 45%-60%, dimasukkan ke dalam gelas beaker 50 mL kemudian ditambah dengan 2,06 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Setelah semua larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim disentrifugasi menggunakan kecepatan 10000 rpm, pada suhu 40°C selama 10 menit. Dihasilkan supernatan dan endapan. Jumlah konsentrasi garam amonium sulfat yang ditambahkan pada masing-masing fraksi didasarkan pada tabel presipitasi amonium sulfat.

#### **3.8 Metode Isoelektrik Point**

Titik Isoelektrik merupakan daerah p tertentu dimana protein tidak mempunyai selisih muatan atau jumlah muatan positif dan

negatif sama, sehingga tidak bergerak apabila diletakkan dalam medan listrik. Pada pH isoelektrik (pI), daya kelarutan protein minimal, sehingga menyebabkan protein mengendap.

Pertama disiapkan 5 tabung reaksi bersih dan kering, lalu dimasukkan 1 ml enzim pada tiap-tiap tabung. Pada setiap tabung ditambahkan 1 ml larutan buffer asetat masing-masing dari pH 3,8; 4,7; 5,0; 5,3; dan 5,9, titik isoelektrik asam amino sistein tidak jauh dari pH 4,3 (Kilara, 1994). Kemudian dikocok, lalu dicatat derajat kekeruhannya setelah 0, 10, dan 30 menit. Diamati berapa tabung yang terbentuk endapan maksimal. Selanjutnya semua tabung dipanaskan diatas penangas air. Diamati hasilnya. Pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik (Burgess dan Thompson, 2002).

### **3.9 Karakterisasi Enzim**

#### **3.9.1 Kandungan protein**

Penentuan kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976). Sebanyak 1 mL larutan enzim ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 5 mL pereaksi Bradford yang sudah diencerkan lima kali. Campuran tersebut divorteks dan didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit. Perlakuan pada blanko, larutan enzim diganti dengan akuades. Selanjutnya larutan tersebut dihomogenkan dan didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang. Absorban larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein sampel dihitung berdasarkan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*). Pada kurva standar protein, larutan enzim digantikan dengan BSA dengan kisaran konsentrasi 0 sampai 1 mg/mL.

#### **3.9.2 Elektroforesis SDS-PAGE**

Persiapan awal yang perlu dilakukan dalam elektroforesis adalah pembuatan gel. Metode yang digunakan dalam pembuatan gel adalah metode Edelstein dan Bollag (1991). Bahan untuk separating gel dicampur satu persatu dengan memasukkan tetrametilen diamina (TEMED) pada akhir campuran. Larutan

tersebut diaduk dan dipipet perlahan ke dalam plate kaca sampai 1.5 cm dari permukaan kaca lalu didiamkan sekitar 15-20 menit. Dalam proses ini diusahakan agar tidak terbentuk gelembung udara. Setelah gel memadat, campuran *stacking gel* dipipet perlahan ke dalam plate kaca lalu dengan segera dimasukkan sisir (10 sumur) sebagai tempat memasukkan sampel.

Sampel yang telah dipanaskan pada 100°C selama 3 menit dicampurkan dengan buffer sampel lalu dilakukan loading sampel ke dalam sumur sebanyak 12 µl. Berbeda halnya dengan sampel, Marker yang di-loading ke dalam sumur sebanyak 10 µl. Sebelum running dilakukan, buffer elektroforesis dimasukkan ke dalam chamber. Running elektroforesis dilakukan pada 100 Volt, 50 mA dalam kondisi dingin. Waktu yang diperlukan untuk running elektroforesis sekitar 1.5 jam

Setelah pemisahan, gel dilepas dari plate kaca lalu direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol + 12% asam asetat) selama 1 jam. Selanjutnya, gel tersebut direndam dalam larutan etanol 50% selama 20 menit dan larutan etanol 30% selama 2 x 20 menit (Edelstein dan Bollag, 1991).

### **3.9.3 Aktivitas enzim**

Enzim yang didapatkan dari sentrifugasi biakan ditambahkan tepung bulu ayam sebanyak 20 mg yang dilarutkan dalam larutan buffer dengan perbandingan enzim dengan larutan buffer sebesar 1:4 (200 µl ekstrak enzim : 800 µl larutan buffer). Untuk mendapatkan pH 7 digunakan 0.2 M *phosphate buffer* (Anitha *et al.*, 2012). Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, larutan didinginkan dalam air es selama 10 menit, Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm (Govarthan *et al.*, 2011).

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan peningkatan 0,01 unit absorbansi per waktu pengukuran (Anitha *et al.*, 2006). Aktivitas keratinase ditentukan berdasarkan rumus (Ali *et al.*, 2011) :

$$\text{Aktivitas (Unit/ml)} = \frac{(4 \times n \times A_{280})}{(0.01 \times T)}$$

Keterangan :     4                                 = volume larutan akhir (mL)  
                              n                                 = faktor pengenceran  
                              A 280                                 = nilai absorbansi (unit)  
                              T                                 = waktu inkubasi (menit)

### 3.10 Rancangan Penelitian

Berdasarkan kombinasi faktor fisika dan kimia dari penelitian sebelumnya bahwa pH dan komposisi medium limbah bulu ayam menentukan hasil produksi keratinase, sehingga variabel diatas dipilih dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yaitu pH (7, 8, dan 9) dan jenis medium (nutrien broth, minimal medium feather meal dan minimal medium ditambah pepton 1%) untuk mendapatkan produksi keratinase yang paling optimum. Data diolah dengan menggunakan Analysis of Varians (ANOVA), bila terdapat perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasilnya berupa profil pertumbuhan bakteri dalam bentuk kurva pertumbuhan dan profil konsentrasi protein serta aktivitas enzim yang dijelaskan secara analisis deskriptif.

**“ Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan produksi keratinase dengan cara menganalisis profil pertumbuhan bakteri, kandungan protein, dan aktivitas keratinase pada variasi pH dan komposisi medium. Medium yang digunakan adalah nutrien broth (NB), medium minimal *feather meal* (MMFM) dan medium minimal *feather meal* ditambah pepton 1%.

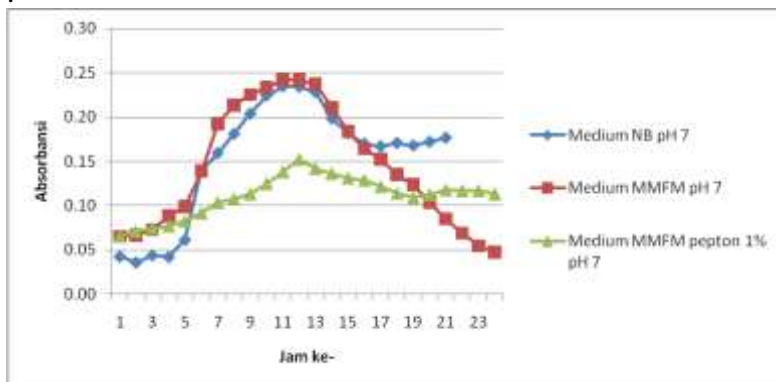
#### 4.1 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* SLII-I

Analisis Kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui waktu yang tepat panen kultur *Bacillus* SLII-I (Gambar 4.1). Dari seleksi medium yang dilakukan berdasarkan pH (7, 8 dan 9), dipilih kondisi yang paling optimum yaitu pada pH 7. Suntornsuk and Suntornsuk (2003) melaporkan, pH awal medium sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri, persentase degradasi bulu dan produksi keratinase. Telah diamati bahwa spesies *Bacillus* yang paling aktif dalam kondisi netral (pH 7), pH optimum untuk *B. cereus* adalah 7,0 (Kim *et al.*, 2001), sedangkan untuk *B. pumilus* adalah 8,0 (El-Refai *et al.*, 2005). Untuk *B. subtilis*, produksi enzim tertinggi diperoleh mulai pH 5 sampai pH 9.

Pada gambar 4.1 tampak bahwa profil kurva pertumbuhan bakteri yang umumnya terdiri atas fase adaptasi (*lag*), eksponensial (*log*), stasioner dan fase kematian (*death*) (Hamdiyati, 2010). Pengukuran nilai *optical density* masing-masing medium dilakukan pada absorbansi maksimal 600 nm. Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan sumbu x sebagai waktu inkubasi dan sumbu y sebagai nilai *optical density* (OD) atau absorbansi (Anitha *et al.*, 2012).

Medium nutrien broth digunakan sebagai medium standart, karena termasuk dalam medium pengkaya, sehingga semua jenis bakteri dapat tumbuh dalam medium nutrien broth. Medium yang paling optimum untuk pertumbuhan yaitu pada minimal medium *feather meal* karena dilihat dari kurva pertumbuhan bakteri,

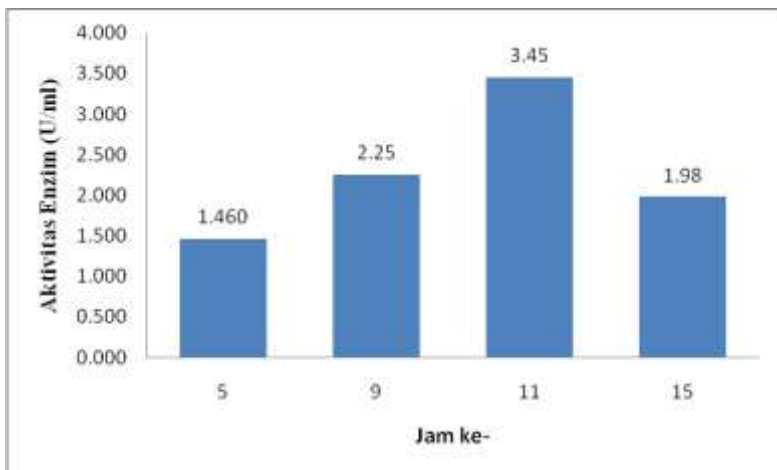
medium tersebut memiliki fase adaptasi (*lag*) yang pendek dan fase eksponensial (*log*) yang tinggi. Kurva pertumbuhan pada minimal medium feather meal pepton 1% memiliki fase adaptasi (*lag*) yang panjang, hal itu dikarenakan *Bacillus* menggunakan pepton dahulu dibanding feather meal. Setelah sumber pepton habis, maka bakteri akan memproduksi keratinase untuk memecah keratin pada bulu ayam untuk sumber C bagi pertumbuhannya. Selain pepton, modifikasi medium dapat dilakukan dengan penambahan glukosa, fosfat, dan glutathionin untuk pengkayaannya (Gupta, 2006).



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan Isolat *Bacillus* SLII-I.

Gambar 4.1 menjelaskan kurva pertumbuhan bakteri setiap medium yang terbaik berdasarkan analisis profil kurva pertumbuhan ditunjukkan bahwa medium yg dimodifikasi dengan nutrien broth menyerupai profil kurva pertumbuhan medium standart, sehingga modifikasi medium minimal feather meal dapat di pastikan mampu menggantikan medium standart. Pengukuran aktivitas keratinase (Gambar 4.2), aktivitas tertinggi terjadi pada medium minimal feather meal dengan pH 7 pada rentan jam ke-11 sampai dengan jam ke-14. Pada waktu tersebut pengambilan sampel untuk ekstrak enzim kasar dilakukan, karena diasumsikan

sebagai waktu yang optimal untuk menghasilkan keratinase paling banyak dan berbanding lurus dengan jumlah sel isolat didalam medium. Aktivitas keratinase diukur dengan menggunakan spektrofotometer secara kuantitatif pada panjang gelombang 280nm yang dapat mendeteksi asam amino sistin pada keratin (Ketaren, 2008). Aktivitas keratinase tertinggi diamati adalah 3.4 Unit/ml pada jam ke-11 dan terendah 1.5 Unit/ml pada dan jam ke-5. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan nilai aktivitas keratinase sebesar 3.35 Unit/ml.



Gambar 4.2 Aktifitas Keratinase pada Minimal Medium Feather Meal pH 7 Kondisi Optimum.

Dari uji statistik dengan Analysis of Varians (ANOVA) *two-way* (Lampiran 2), pada kurva pertumbuhan bakteri dapat disimpulkan bahwa faktor pH dan medium berpengaruh nyata (nilai  $p$  value  $< 0.05$ ). Kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan perlakuan yang signifikan pada pH 8 dan 9 di medium nutrien broth dan minimal medium feather meal, sedangkan pH 7 di medium minimal feather meal pepton 1% terdapat perbedaan perlakuan yang

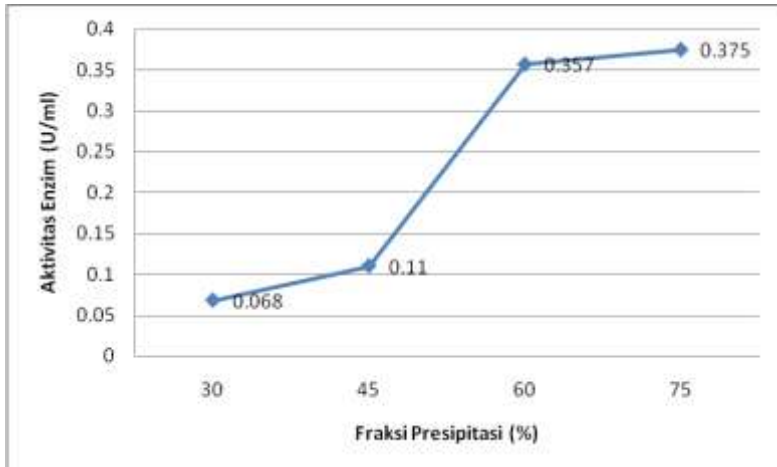


signifikan. Pada faktor pH, terdapat 3 macam pH yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 7,8, dan 9.

Dari hasil uji Duncan, pada pH 7 terdapat perbedaan perlakuan yang signifikan karena pH 7 merupakan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan *Bacillus* SLII-I. Faktor pH sangat penting untuk mempengaruhi fisiologi mikroorganisme dengan mempengaruhi kelarutan hara dan serapan, aktivitas enzim, membran sel morfologi, pembentukan produk sampingan dan reaksi oksidatif-reduktif. Selama produksi keratinase, pemanfaatan keratin terjadi lebih cepat sebagian besar pada pH 7,5 (Suntornsuk and Suntornsuk, 2003). Friedrich and Antranikian (1996) menjelaskan bahwa produksi keratinase maksimum pada pH basa. Untuk *B. subtilis*, produksi enzim tertinggi telah dilaporkan pada rentang pH 7 sampai 9.

#### **4.2 Metode Amonium Sulfat**

Metode ammonium sulfat bertujuan untuk memisahkan keratinase dengan senyawa lainnya. Pengendapan menggunakan garam didasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam, dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, keratinase dapat mengendap pada fraksi 75% dengan aktivitas keratinase sebesar 0.375 Unit/ml, yang berarti untuk menghidrolisis 1  $\mu$ mol keratin dibutuhkan 1 ml keratinase (Keikha *et al.*, 2012).



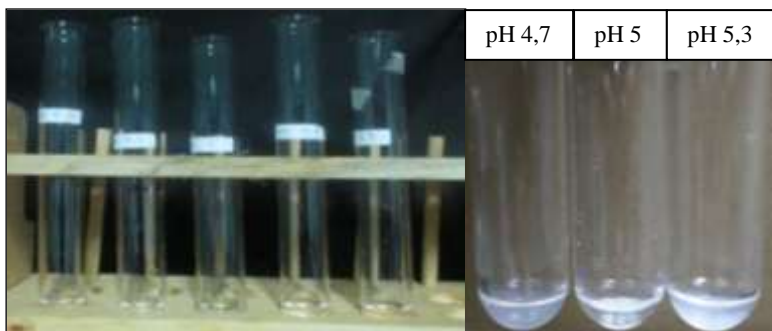
Gambar 4.3 Aktivitas Keratinase Tiap Fraksi Presipitasi Amonium Sulfat.

Kelarutan protein (pada pH dan suhu tertentu) meningkat pada kenaikan konsentrasi garam (*salting in*). Penambahan garam tertentu akan menyebabkan kelarutan protein menurun (*salting out*). Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein, oleh karena itu menyebabkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap. Amonium sulfat merupakan garam yang paling sering digunakan untuk mengendapkan protein karena memiliki daya larut tinggi didalam air, selain itu harganya relatif tidak mahal (Scopes, 1987).

Pengukuran aktivitas keratinase dari hasil presipitasi ammonium sulfat. Dari hasil yang didapatkan, aktivitas keratinase pada fraksi 75% sebesar 0.375 unit/ml, sehingga tiap 1 unit enzim keratinase dibutuhkan untuk membebaskan 1  $\mu$ mol keratin dari minimal medium feather meal dalam kondisi standart (Keikha *et al.*, 2012).

### 4.3 Metode Isoelektrik point

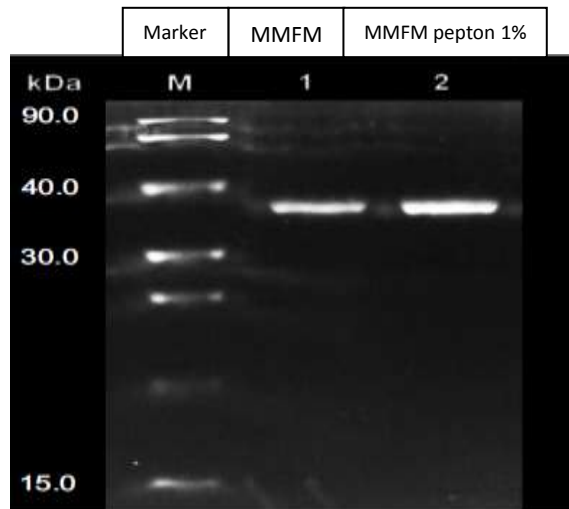
Titik isoelektrik merupakan suatu kondisi pada saat sebuah protein tidak memiliki selisih muatan atau jumlah antara muatan positif dan negatif sama, sehingga tingkat kelarutan protein menurun dan mencapai angka terendah yang berakibat apabila diletakkan dalam medan listrik akan memiliki jumlah kation dan anion yang sama. pH disebut sebagai titik isoelektrik (pI) di mana muatan total pada molekul adalah nol, merupakan karakteristik dari masing-masing enzim, di mana kelarutan dalam larutan air umumnya minimum. Dalam larutan, kelompok yang bermuatan akan berinteraksi dengan molekul air yang bersifat polar dan akan menstabilkan protein karena bersifat hidrofobik. Sebagian besar rantai samping alifatik atau aromatik merupakan ciri protein yang kurang larut dalam air. Salah satu contoh dari pI adalah jumlah kelompok terionisasi meningkat karena kelarutan cenderung meningkat. Oleh karena itu titik isoelektrik adalah hal yang penting karena mempengaruhi kelarutan dan interaksi protein (Öztürk, 2001). Titik isoelektrik dari ekstrak enzim kasar pada medium *feather meal* adalah pH 5,3. Menurut penelitian Hsin-hung lin (2010) titik isoelektrik pada keratinase berkisar antara pH 3,5 - 9,5.



Gambar 4.4 Titik *Isoelectric Point* Keratinase.

#### 4.4 Elektroforesis SDS-PAGE

Sodium dodesyl sulphate (SDS) – polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) merupakan metode yang digunakan untuk karakterisasi enzim dan bertujuan untuk mengetahui berat molekul suatu protein. Penggunaan SDS berfungsi untuk mendenaturasi protein karena SDS bersifat sebagai deterjen yang mengakibat ikatan dalam protein terputus membentuk protein yang dapat terelusi dalam gel (Weaver, 2005). Sampel enzim yang diinjeksikan ke dalam sumur gel diberi warna dengan bromphenol biru yang dapat terionisasi. Fungsi pewarna adalah untuk membantu memonitor jalannya elektroforesis (Wilson dan Walker, 2000). Gel poliakrilamid dengan stacking gel 4% dan separating 12%, pada tegangan listrik 120 volt 28 A. Berat molekul enzim keratinases berkisar antara 15 sampai 240 kDa (Gupta *et al.*, 2006). Namun menurut Prakash *et al.* (2010) sebagian besar berat molekul enzim keratinase berada pada kisaran 20 sampai 50 kDa. Dari hasil SDS-PAGE diketahui bahwa berat molekul protein keratinae pada penelitian ini adalah 38 kDa.



Gambar 4.5 SDS-PAGE.

**“ Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri *Bacillus* SL II-I tumbuh optimum pada minimal medium *feather meal* pH 7 jam ke-11 dengan aktivitas keratinase tertinggi mencapai 3.4 Unit/ml. Berdasarkan parsial purifikasi terhadap ekstrak kasar keratinase menggunakan ammonium sulfat protein tercapai maksimal pada konsentrasi 75% dengan aktivitas keratinase sebesar 0.375 Unit/ml. Karakterisasi titik isoelektrik keratinase tercapai pada pH 5.3 dengan berat molekul 38 kDa.

#### **5.2 Saran**

Dari hasil penelitian ini, perlu adanya produksi yang lebih besar untuk memenuhi permintaan pasar produksi pakan ternak. Selain itu perlu dilakukan meneliti faktor lain seperti :

1. Menghitung kadar protein total, protein terlarut dan jumlah keratin terdegradasi.
2. Mengetahui pengaruh sumber protein limbah bulu ayam dalam pakan ternak.

**“ Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR PUSTAKA

Adiati, U., W. Puastuti, dan Mathius. 2002. **Eksplorasi Potensi Produk Samping Rumah Potong Bulu dan Darah sebagai Bahan Pakan Pangan Imbuhan Pascarumen.** Bogor : Laporan penelitian Balai peternakan Ternak Ciawi.

Agrahari, A.K., S.K. Panda, A. Meher, A.R. Padhan and M. Khaliquzzam, 2010. Phytochemical Screening of *Curculigo Orchioides* Gaertn. Root Tubers. **Journal Chemical Pharmation** 2:107-111.

Aulanni'am. 2005. **Protein dan Analisinya.** Malang : Citra Mentari Group.

Anitha, A. dan R. Eswari. 2012. Impact of Newly Isolated *Bacillus megaterium* (A1) on Degradation of Feather Waste. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 1: 212-221.

Atlas, R.M. dan Bartha, R. 1987. **Microbial Ecology, Fundamental and Application, 2<sup>nd</sup> edition.** California : The Benjamin Cumming Publishing Company, Inc. Menlo Par 560 pp.

Badan Pusat Statistik. 2005. **Jawa Timur dalam Angka.** Surabaya : Badan Pusat Statistik Jawa Timur.

Badan Pusat Statistik. 2012. **Jawa Timur dalam Angka.** Surabaya : Badan Pusat Statistik Jawa Timur.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms quantities of protein in



utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem** 72:248-254.

Bollag DM, Edelstein SJ. 1991. **Protein Methods**. New York: Wiley-Liss.

Boyer, H. W., and Carlton. B. C., 1971, Production of Two Proteolytic Enzymes by A Transformable Strain of *Bacillus subtilis*, **Arch. Biochemical Biophysis** 128:442-455.

Burgess, Thomson, Anthony C. Grabski1 and Richard R. 2002. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips1. **Applied Microbiology and Biotechnology** 62: 191-201.

Casarin, F., F. Cladera-Olivera, A. Brandelli. 2008. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food Bioprocess Technol.** 1:301-305.

Deivasigamani, B. dan Alagappan, K.M. 2008. Industrial Application Of Keratinase and Soluble Proteins From Feather Keratins. **Journal Environmental Biology** 29:933-936.

El-Refai, H. A., M. A. Abdel Naby, A. Gaballa, M. H. El-Araby, A. F. Abdel. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH 9 keratinolytic activity. **Process Biochem.** 40:2325-2332.

Friedrich, A.B. and G. Antranikian. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:2875-2882.

Gaman, P.M, K.B. Sherrington. 1994. **Ilmu Pangan, Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi**. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada Press.

Gupta *et al.*, 2006. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.** 59(1):15-32

Govarthanan, M., T.Selvankumar. and S.Arunprakash. 2011. Production of Keratinolytic Enzyme by A Newly Isolated Feather Degrading *Bacillus* sp. from Chick Feather Waste. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 2:259-265.

Hsin-Hung Lin and Li-Jung Yin. 2010. Feather Meal and Rice Husk Enhanced Keratinases Production by *Bacillus licheniformis* YJ4 and Characters of Produced Keratinases. **Journal of Marine Science and Technology**. 18(3): 458-465.

Jahan, Z., S.N. Khan dan M.M. Hoq. 2010. Screening of Keratinolytic Bacteria from Poultry Wastes. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research** 45:261-266.

Janson, J.C., and L. Ryden. 1998. **Protein purification**. New York : John Willey dan Sons. Inc.

Jayalakshmi,T., P. Krishnamoorthy, G.R. Kumar dan P. Sivamani. 2011. Purification and Characterization of Keratinase Enzyme from *Streptomyces* species JRS 19. **New York Science Journal** 4:59-67.

Johnvesly, B. dan Naik, G.R. 2001. Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and

Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a Chemically Defined medium. **Process Biochemistry** 37:139-144.

Johsi A.K. Ortiz G. Crossa J. Singh G. Sharma R.C. Chand R. Parsad R. 2007. Combining Superior Agronomic Performance and Terminal Heat Tolerance With Resistance to Spotblotch (*Bipolaris oryzae*) of Wheat in the Warm Humid Gangetic Plains of South Asia. **Field Crops Research** 103:53-61.

Judoamidjojo, dkk. 1992. **Teknologi Fermentasi**. Edisi 1 cetakan 1. Jakarta: Rajawali Press.

Kaluzewska, M., K. Wawrzekiewicz and J. Lobarzewski. 1991. Microscopic Examination of Keratin Substrates Subjected to the Action of the Enzymes of *Streptomyces fradiae*. **International Biodeterioration** 127:11-26.

Kanmani P, Karuppasamy P, Pothiraj C. and Venkatesan A. 2011. Studies On Lignocellulose Biodegradation of Coir Waste in Solid State Fermentation Using *Phanerochaete chrysosporium* and *Rhizopus stolonifer*. **African Journal of Biotechnology** 8:6880-6887.

Ketaren, S. 2008. **Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan**. Jakarta : UI Press.

Kim, J. M., W. J. Lim, H. J. Suh. 2001. Feather degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochem.** 37:287-291.

Kosim, M. 2010. **Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis***. Surabaya : ITS press.

Kunert J. 2000. **Physiology of Keratinophilic Fungi**. Revista Iberoamericana Micologia. Bilbao. 66-85.

Lee, J. M. 1992. **Biochemical Engineering**. New Jersey : Prentice Hall Inc.

Lehninger.A.L, 1995. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jakarta : Erlangga.

Martoharsono, S. 1994. **Biokimia jilid 1**. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.

Mazotto, A.M., R.R.R. Coelho, S.M.L. Cedrola, M.F. de Lima, S. Couri, E.P. de Souza dan A. B. Vermelho. 2011. Keratinase Production by Three *Bacillus* spp. Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation. **Enzyme Research** 1-7.

McKee, T., dan McKee, J.R. 2003. **Biochemistry: The Molecular Basis Of Life**. Boston : The McGraw-Hill.

Öztürk B. 2001. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports M.S. **Thesis**. Izmir : Biotechnology Department. İzmir Institute of Technology.

Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan, 1986, Penterjemah , Ratna Siri Hadioetomo. **Dasar-Dasar Mikrobiologi 1**. Jakarta : Universitas Indonesia Press.

Pissuwan D, Stella M. Valenzuela, dan Michael B. Cortie. 2008. Prospects for Gold Nanorod Particles in Diagnostic and Therapeutic Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 25:93-112.

Rasyaf, M. 1996. **Beternak Ayam Petelur**. Jakarta : Penebar Swadaya.

Riffel, A. dan A. Brandelli. 2006. Keratinolytic Bacteria Isolated from Feather Waste. **Brazilian Journal of Microbiology** 37:395-399.

Scopes RK. 1987. **Protein Purification Principles and Practice**. Edisi ke-2. New York: SpringerVerlag.

Sinoy, Tom E.S, Bhausahab, Chavaan Pooja and Pratiksha, Patre Rajendra. 2011. Isolation and Identification of Feather Degradable Microorganism. **VSRD-TNTJ** 2:128-136.

Sitompul S. 2004. Analisis Asam Amino dalam Tepung Ikan dan Bungkil Kedelai. **Buletin Teknik Pertanian** 9:33-37.

Sivakumar T., Shankar T., Vijayabaskar P. and Ramasubramanian V. 2012. Optimization for Keratinase Enzyme Production Using *Bacillus thuringiensis* TS2. **Academic Journal of Plant Sciences** 5:102-109.

Statistik Lingkungan Hidup dan Wilayah. 2000. **Statistik Lingkungan Hidup dan Wilayah 1999**. Jakarta : Badan Pusat Statistik.

Sun, H.J., H.K. Lee. 2001. Characterization of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus subtilis* KS-1. **Journal Protein Chemistry** 20:165-169.

Suntornsuk W, Tongjun J, Onnim P, Oyama H, Ratanakanokchai K,. 2005. Purification and Characterization of Keratinase from A Thermotolerant Feather Degrading Bacterium. **World Journal Microbiol Biotechnology** 21:1111-1117.

Suntornsuk, W., Suntornsuk, L. 2003. Feather Degradation by *Bacillus* sp. FK46 in Submerged Cultivation. **Bioresource Technology** 86:239-243.

Suwedo, Hadiwiyo. 1994. **Teori dan Prosedur : Pengujian Protein**. Yogyakarta : Liberty.

Sorensen, H.S., and Sorensen, C.B., and Michaelsen. 1999. **Chromatographi and Capillary Electrophoresis in Food Analysis**. UK : MPG Books, Ltd.

Tiwary, E., Gupta, R. 2012. Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques** 2:1-5.

Tsujibo, H., K. Minoura, K. Miyamoto, H. Endo, M. Moriwaki & Y. Inamori. 1993. Purification and properties of thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. **Applied Environment Microbiology** 8:620-622.

Weaver IC. 2005. **Early Environmental Regulation of Hippocampal Glucocorticoid Receptor Gene Expression**. International Publishing. Ann NY Acad Sci 1024:182-212.

Wilson K. 1994. **Protein and enzyme techniques In Practical Biochemistry**, London : Cambridge University Press.

Yurnaliza. 2002. **Senyawa Khitin dan Kajian Aktivitas Enzim Mikrobial Pendegradasinya**. Medan : Program Studi Biologi FMIPA USU.

Zang, B., Z.W. Sun., D.D. Jiang. dan T.G. Niu. 2009. Isolation and Purification of Alkaline Keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. **African Journal of Biotechnology** 8:2598-2603.

## BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Lumajang, 4 November 1992. Remaja yang bernama Ahmad Marzuki Rahmatullah ini memulai pendidikan pada tahun 1996 di Taman Kanak-kanak Dharma Wanita Kota Lumajang. Kemudian melanjutkan pendidikan dasar di SDN Selokgondang 01. Setelah dari sekolah dasar penulis mengenyam pendidikan menengah pertama di MTsN Lumajang pada tahun 2004 dan pendidikan menengah atas di SMAN 3 Lumajang kelas IPA, lulus pada tahun 2010. Penulis melanjutkan ke salah satu Perguruan Tinggi Negeri (PTN) di Jawa Timur yaitu Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya (ITS) jurusan Biologi melalui jalur SNMPTN. Sejak kuliah di kampus ITS remaja yang *hobby* futsal ini aktif mengikuti kegiatan organisasi maupun pelatihan yang diselenggarakan didalam maupun diluar kampus ITS, seperti Himpunan Mahasiswa Biologi ITS, PECUK, GERIGI ITS, Biological Opus Fair, Forum Kajian Islam Qurani (FKIQ), ESQ Leadership Training, LKMM pra-TD FMIPA ITS, LKMM TD, Panitia Rayon Lumajang (Pengawas) Olimpiade Matematika VEKTOR UM (Universitas Negeri Malang). Laki-laki 3 bersaudara ini pernah menjadi asisten dosen pada mata kuliah biologi umum, genetika, perkembangan hewan dan fisiologi tumbuhan. Dalam menyelesaikan studinya, Tugas Akhir penulis berjudul “Optimasi Produksi Keratinase Oleh Bakteri *Bacillus* SL II-I Dalam Medium Limbah Bulu Ayam”, penelitian tersebut dilakukan dilaboratorium *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS.